



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MARIANA CANDIDA LEITE
TAINARA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO NO
COMPORTAMENTO DE FASE E NA ATIVIDADE LARVICIDA
DE EMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus*
sinensis

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2017

MARIANA CANDIDA LEITE

TAINARA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO NO
COMPORTAMENTO DE FASE E NA ATIVIDADE LARVICIDA
DE EMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus*
sinensis

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel, orientado pela professora Dr^a
Rogéria de Souza Nunes.

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2017

MARIANA CANDIDA LEITE
TAINARA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO NO
COMPORTAMENTO DE FASE E NA ATIVIDADE LARVICIDA
DE EMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus*
sinensis

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel, orientado pela professora Dr^a.
Rogéria de Souza Nunes.

Aprovada em:

Orientadora: Prof. Dra. Rogéria de Souza Nunes

Coorientadora: Glauciene da Silva Santos

1º Examinador:

2º Examinador:

São Cristóvão –SE

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter nos dado forças durante toda a trajetória e nos guiado até o fim, dedicamos a Ti essa vitória e nossa vida.

Aos nossos pais por nunca terem desistido de nós, pela educação, pela paciência, pela sabedoria ensinada, pelo amor e por nos ensinarem o quanto vale a pena nos esforçarmos.

Agradecemos a nossa orientadora Rogéria Nunes, por toda dedicação e comprometimento ofertados a nós. Obrigada por todo carinho e atenção, não somente como orientadora, mas como amiga que se tornou.

Somos gratas também a todos que mostraram empenho a nosso trabalho em especial a Jeferson que foi incrível em todos os momentos, nos dando apoio não medindo esforços para nos ajudar. Te amamos, nosso anjo da guarda. A nossa coorientadora Glauciene por ter nos guiado e auxiliado no desenvolvimento deste trabalho. E a todos que contribuíram, Jefferson Costa, Kelvin, Bruna e Mônica, ao NUESC-UNIT especialmente a Aline Leite e Denisson. A todos que ajudaram no mutirão da laranja. Vocês fazem parte dessa vitória!

O caminho é longo, mas, o sucesso é certo.

RESUMO

O comportamento de fase de emulsões contendo álcool cetílico propoxilado etoxilado (PROCETYL AWS®), água e óleo essencial de *Citrus sinensis*, foi avaliado. A variação na concentração de tensoativo sugere a formação de emulsões com diferente comportamento de fase. Em maiores concentrações de tensoativo foi sugerido a estruturas de comportamento próximo de mesofase líquido-cristalina do tipo hexagonal menos organizada e em menores concentrações foi sugerido um comportamento de fase semelhante ao de mesofase líquido-cristalina do tipo hexagonal mais organizada. Avaliação que foi possível através da correlação existente entre os picos apresentados nas curvas de SAXS. A presença de diferentes comportamentos de fase resultou em otimização do efeito larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*. A formulação E1 (25% da mistura tensoativo-cotensoativo) apresentou CL₅₀ de 18,47ppm. A formulação E3 (10% da mistura tensoativo-cotensoativo) apresentou CL₅₀ de 12, 5347ppm. Resultado que confirma que a presença de mesofase líquido-cristalina interfere na resposta biológica pois são domínios em dimensões nanométricas, presentes no filme interfacial, que possivelmente otimizam a dispersão da fase oleosa dispersa na fase aquosa dispersante.

Palavras-chave: óleos essenciais, cristal líquido, emulsões, atividade larvicida

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

(A /O):	Água/óleo
(O/A):	Óleo/água
(A/O/A):	Água/óleo/água
CMC:	Concentração Micelar Crítica
EM:	Emulsão
EHL:	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
OE:	Óleo Essencial
OECS:	Óleo Essencial Citrus sinensis
PEC:	Fator de empacotamento crítico
PPM:	Partes por Milhões
%:	Porcentagem
PPG-5:	Procetyl
SF:	Separação de Fases
SAXS:	Espalhamento de Raio x a Baixo Ângulo
UFS:	Universidade Federal de Sergipe

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formas de empacotamento crítico possíveis para moléculas de substâncias tensoativas em função de diferentes valores de empacotamento crítico. Adaptado de CARVALHO, 2009.	16
Tabela 2. Composição centesimal das amostras selecionadas do diagrama. Fase Aquosa: Água. Tensoativo: Procetyl® e Cotensoativo: Ácido Oleico, Óleo essencial: Citrus sinensis.	22
Tabela 3. CL50 das amostras E1,e E3 frente às larvas de Ae. aegypti em L3/ L4, após 24hs de exposição.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sentido de fase das emulsões.....	12
Figura 2. Classificação dos tensoativos.....	13
Figura 3. Escala EHL com classificação e função tensoativa.	13
Figura 4. Tipos de separação em emulsões	15
Figura 5. Envelhecimento de Ostwald.....	16
Figura 6. Curvas de SAXS das emulsões E1 e E3	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1	EMULSÃO.....	12
2.2	ÓLEOS ESSENCIAS (OEs)	18
2.3	ÓLEO ESSENCIAL <i>CITRUS SINENSIS</i> (OECS)	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	21
4.1.1	Materiais	21
4.1.2	Reagentes	21
4.1.3	Equipamentos.....	21
4.2	MÉTODOS.....	21
4.2.1	Preparação das formulações.....	21
4.2.2	Avaliação estrutural por espalhamento de raio X a baixo ângulo	22
4.2.3	Atividade Larvicida	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1	COMPORTAMENTO DE FASE.....	24
5.2	ATIVIDADE LARVICIDA.....	26
6	CONCLUSÃO.....	28
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, que consistem em uma mistura entre dois líquidos imiscíveis (óleo e água) geralmente formando duas fases. A estabilidade das emulsões é favorecida pela presença de um agente de tensão superficial. O tensoativo é o responsável por diminuir a tensão entre o óleo e a água uma vez que apresenta regiões com diferentes polaridades. É uma molécula anfifílica.

É possível classificar os tensoativos em função da presença e/ou ausência de carga no grupamento polar. Desta forma, são divididos em dois grupos: os iônicos e não-iônicos. A presença ou ausência de carga apresenta-se como um importante parâmetro para a escolha do tensoativo, uma vez que interfere na estabilidade físico-química das emulsões principalmente em função de variações do pH do meio. A molécula do tensoativo também pode ser classificada quanto a contribuição da porção polar e apolar na estabilização de emulsões. Esta classificação baseia-se no equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). Sendo estabelecida para tensoativos não iônicos.

A habilidade dos tensoativos em baixar a tensão entre superfícies depende de sua estrutura molecular, considerando a presença ou ausência de carga e também do EHL. Esta habilidade é expressa em concentração. A concentração micelar crítica (CMC) representa a concentração mínima do tensoativo capaz de diminuir a tensão entre as superfícies. O fator de empacotamento crítico (PEC) é outro parâmetro que define o papel do tensoativo em estabilizar emulsões, assim como outros sistemas estabilizados por tensoativos. O PEC descreve a geometria de empacotamento da porção apolar do tensoativo. E a partir do conhecimento do PEC é possível prever os tipos de agregados que os tensoativos podem formar. O tipo de agregado formado pode influenciar a estabilidade de emulsões assim como otimizar a resposta biológica de uma substância ativa em função de uma melhor dispersão entre as fases.

Diante do exposto, foi objetivo do presente trabalho avaliar a influência da concentração do tensoativo no comportamento de fase e na atividade larvívora de emulsões O/A cuja fase oleosa foi o óleo essencial de *Citrus sinensis*. O referido óleo apresenta atividade larvívora contra larvas de *Ae. aegypti*, e o álcool cetílico etoxilado e propoxilado, de nome comercial Procetyl AWS® tensoativo utilizado, apresenta habilidade de formar diferentes tipos de agregados incluindo mesofases líquido cristalina, apresentando assim diferentes comportamentos de fases.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EMULSÃO

Emulsões são sistemas heterogêneos (figura 1), termodinamicamente instáveis, compostos, por pelo menos, duas fases imiscíveis entre si (água e óleo) e pelo menos um terceiro componente (tensoativo) responsável pela estabilização da dispersão. Estes sistemas apresentam uma fase dispersa e outra fase dispersante ou contínua. A presença de tensoativo possibilita a estabilização do sistema a partir da formação de um filme interfacial. A fase dispersa se apresenta na forma de gotículas e a disposição do sentido de fase vai depender do tensoativo utilizado e do volume entre as fases, podendo apresentar sentido de fase óleo/água (fase interna/externa) ou água/óleo (fase interna/externa) (ZANON et al., 2010).

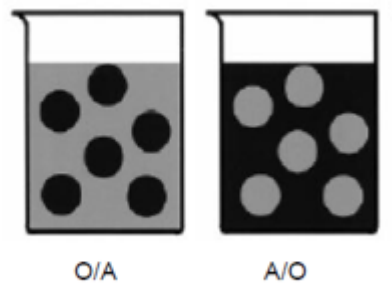


Figura 1. Sentido de fase das emulsões (ZANON et al., 2010).

Na estabilização das emulsões os tensoativos têm como principal função a redução da tensão interfacial entre as fases imiscíveis devido a sua estrutura anfifílica. Estes formam um filme em monocamada que atua como barreira física. A presença ou a ausência de carga elétrica é um parâmetro de classificação a ser considerado, uma vez que influencia a estabilidade física das emulsões (ROSS, 2002; ZETA-METER Inc., 2006). Neste contexto, os tensoativos são classificados de acordo com a presença e ausência de carga elétrica (iônicos e não iônico); quanto ao equilíbrio hidrófilo lipófilo e quanto ao fator de empacotamento crítico (PEC) (DALTIM, 2011).

Os tensoativos são classificados em: iônicos (catiônicos, aniônicos e anfóteros) e não iônicos. (SILVA, 2008). Conforme representação na figura 2.

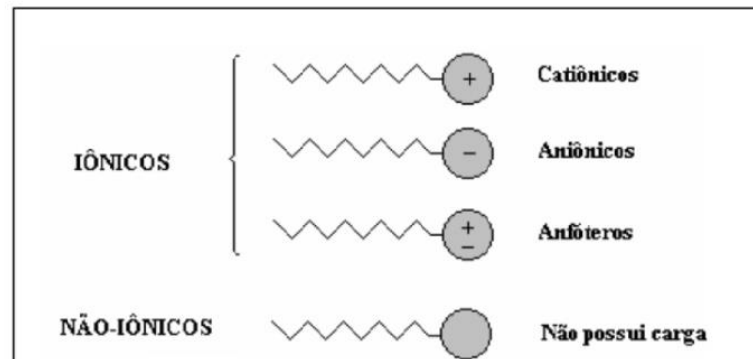


Figura 2. Classificação dos tensoativos (SILVA,2008)

- Tensoativos catiônicos: ao se dissociarem no meio aquoso as partes hidrofílicas formam íons carregados positivamente.
- Tensoativos aniônicos: ao se dissociarem no meio aquoso as partes hidrofílicas formam íons carregados negativamente.
- Tensoativos anfóteros: apresentam comportamento aniônico ou catiônico a depender do pH do meio).
- Não-iônicos: em meio aquoso não apresentam íons, sendo que sua solubilidade em água depende da presença de grupos funcionais em sua molécula.

Os tensoativos não iônicos, devido à ausência de carga, podem ser classificados segundo o EHL. GRIFFIN (1949) desenvolveu uma escala numérica arbitrária, que descreve valores para o EHL (figura 3). E determina a funcionalidade dos tensoativos.

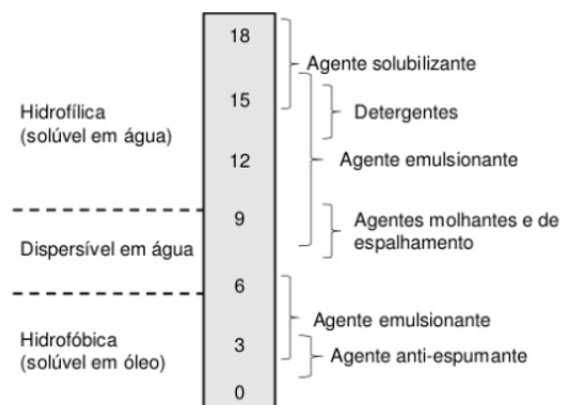


Figura 3. Escala EHL com classificação e função tensoativa. (GRIFFIN 1949)

O conceito de EHL reconhece que todas as substâncias tensoativas são constituídas por uma parte hidrossolúvel e outra lipossolúvel dependendo a sua solubilidade do balanço entre as duas. Como demonstrado na figura 3, substâncias com valor de EHL muito baixo, portanto acentuadamente lipófilas são agentes antiespumantes. Aquelas cujo EHL varia de 3 a 9, possui ainda características de lipofilia, constitui os agentes emulsivos A/O, mas a partir de 8 os tensoativos começam a apresentar propriedades hidrófilas, as quais se acentuam com a subida do respectivo valor de EHL. Os valores de EHL de 8 a 16 engloba os agentes emulsivos O/A, situando-se os agentes solubilizantes de 16 a 18. (HOLMBERG et al, 2002).

É possível combinar dois tensoativos, de modo a conseguir determinado valor de EHL para assim obtermos uma preparação com o máximo de estabilidade. O uso desta prática resulta em emulsões mais estáveis, pois tais misturas de tensoativos atuam de maneira complexa podendo exercer uma ou várias das seguintes ações: originar EHL mais adequado em função da mistura entre o óleo e água, assim como estabelecer uma película interfacial mais estável. A maior estabilidade do filme interfacial contribui para estabilização da emulsão porque diminui a tensão interfacial mais acentuadamente quando comparado a utilização de um único agente emulsivo. (DANTAS, 2007)

Uma característica de grande importância dos tensoativos é a concentração CMC, que representa a concentração mínima na qual o tensoativo em meio aquoso ou oleoso começa a formar micelas. (ROSSI et al.,2007). Quando a concentração de tensoativo atinge a CMC a tensão superficial do meio é reduzida. (HOLMBERG et al., 2002). O valor de CMC pode sofrer influência de diversos aspectos como comprimento de cadeia, adição de eletrólitos ou ainda presença de impurezas (RAO, 2004; ROSEN, 1989).

A mistura entre o tensoativo e a água (A), o tensoativo, a água e o óleo (O), pode formar diversas estruturas por auto associação, as quais podem estar em escala nano ou microscópica. Entre elas estão micelas normais (onde cabeças do tensoativo estão voltadas para fase externa e caudas para fase interna), micelas reversas (cabeças do tensoativo voltadas para fase interna e caudas para fase externa), microemulsões (O/A ou A/O), emulsões (O/A ou A/O), mesofases líquido cristalina hexagonal (micelas cilíndricas formando um hexágono), mesofases líquido cristalina lamelar (moléculas de tensoativos organizada em bicamadas), mesofases líquido cristalina em fase cúbica. (LAWRENCE; RESS, 2012).

O conceito de estabilidade em dispersões entre água e óleo é compreendido pelo tipo de agregado formado. No caso das emulsões as gotículas apresentam dimensões micrométricas,

fator que compromete a termodinâmica do sistema. Tornando-o um sistema entrópico com baixa estabilidade física. A gotícula dispersa apresenta-se com uma geometria esférica, forma de menor energia de superfície, recoberta pelo filme interfacial produto da agregação de tensoativos e se mantêm em constante e errático movimento, chamado browniano graças à repulsão entre elas, causada pela presença de cargas elétricas ou impedimento estérico. (MAGALHÕES, 2007)

A baixa estabilidade das emulsões pode ser acompanhada pela observação do mecanismo de desestabilização. Sendo ele a coalescência, floculação, “creaming”, separação de fases como demonstrado nas figuras 4-5.

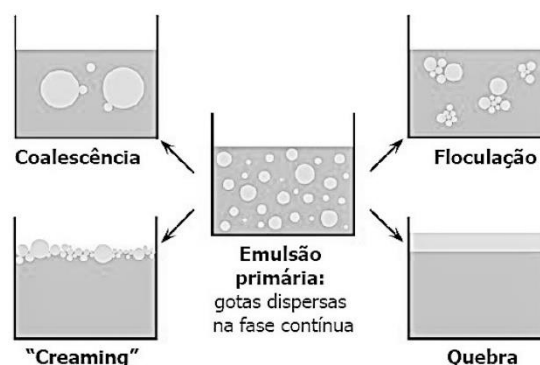


Figura 4. Tipos de separação em emulsões (TADROS, T. 2004)

- Coalescência: ocorre com a união de duas ou mais parcelas de uma fase em prol da formação de uma única.
- Floculação: as gotas da fase dispersa se aproximam, mas ainda se mantêm separadas por uma fina camada de líquido.
- Creaming: resulta de uma diferença de densidade entre as duas fases e consiste na migração de uma das substâncias para o topo da emulsão.
- Quebra: a fase dispersa pode se tornar a fase contínua, separada da dispersão média por uma única interface.
- Envelhecimento de Ostwald: consiste no crescimento do raio da gotícula e na diminuição do número total das gotículas dispersas

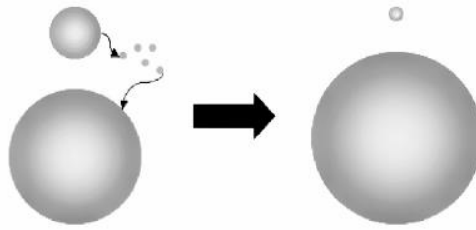






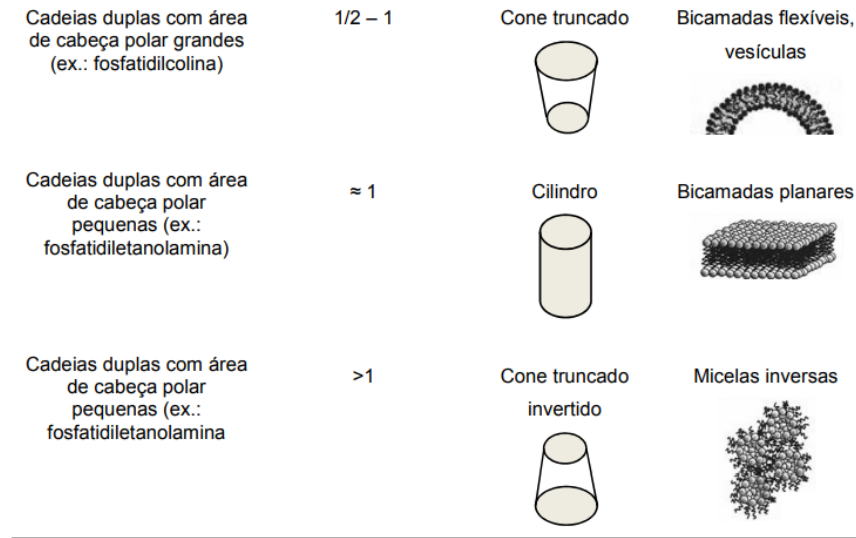
Figura 5. Envelhecimento de Ostwald. (DALTIM, 2012)

Uma maneira de minimizar o fenômeno de instabilidade é a escolha adequada do tensoativo. (SILVA e SOARES, 1996; RIBEIRO, 2002).

O fator de empacotamento crítico é um outro parâmetro a ser avaliado, é definido como a habilidade dos tensoativos de formar diferentes estruturas geométricas quando são incorporados em água ou em misturas de água e óleo (LAWRENCE; REES, 2000; KREILGAARD et al., 2002). Esse fenômeno de organização molecular para atingir a estabilidade termodinâmica é a base para que se aplique tensoativos como potencial sistema de liberação (CARVALHO, 2009). As possíveis estruturas que os tensoativos podem formar são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Formas de empacotamento crítico possíveis para moléculas de substâncias tensoativas em função de diferentes valores de empacotamento crítico. Adaptado de CARVALHO, 2009.

Tensoativo	Parâmetro de empacotamento crítico ($v/a_0 l_c$)	Forma do empacotamento crítico	Estruturas formadas
Cadeia simples com áreas de cabeça polar grandes (ex.: SDS em presença de baixos teores de sal)	$< 1/3$	Cone 	Micelas esféricas 
Cadeia simples com áreas de cabeça polar pequenas (ex.: SDS em presença de altos teores de sal)	$1/3 - 1/2$	Cone truncado 	Micelas cilíndricas 



As emulsões que apresentam cristais líquidos em sua estrutura têm sido veículos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas e cosméticas. Desde 1889 que os cristais líquidos são conhecidos, quando Lehmann observou e descreveu a existência de um estado intermediário da matéria entre o sólido e o líquido. Porém, só em 1922, Friedel usou o termo estado mesomórfico (mesos = intermediário, morphé = forma) (ANDRADE, 2008).

Os cristais líquidos são estruturas encontradas num estado intermediário da matéria, que estão entre o estado sólido cristalino e o estado líquido isotrópico, podendo também ser denominado de mesofase ou estado mesomórfico (TOPAN, 2012). As fases líquido-cristalinas são fluídos complexos anisotrópicos que existem como resultado da ordenação das moléculas de tensoativo, armazenando água entre suas lamelas. Essas estruturas promovem maior estabilização de emulsões, aumento na viscosidade do sistema e forma uma interface ao redor da gotícula dispersa impedindo a coalescência. As técnicas mais utilizadas para identificação de cristais líquidos é a microscopia ótica sob luz polarizada, porém, existem outras técnicas mais precisas como o espalhamento de raios-X a baixo ângulo, ressonância magnética nuclear, calorimetria e a reologia (SANTOS, 2006).

Os cristais líquidos apresentam anisotropias, semelhante às de um sólido cristalino anisotrópico, e propriedades mecânicas semelhantes aos dos líquidos, o que caracteriza sua fluidez. São divididos em duas classes: termotrópicos (dependentes de temperatura) e liotrópicos (dependentes de concentração de tensoativo). Os cristais líquidos termotrópicos podem ser subdivididos em: esmétrico, nemático e colestérico, já os liotrópicos podem ser subdivididos em: lamelar, hexagonal e cúbico (TOPAN, 2012).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAS (OES)

Óleos Essenciais são compostos voláteis e misturas complexas de substâncias de origem natural, são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas, líquidos límpidos, solúveis em solventes orgânicos e lipossolúveis e com densidade geralmente menor que a da água. Desempenha um importante papel de proteção para as plantas que os produzem. (BAKKALI *et al.*;2008). Por apresentarem algumas funções de agentes na atração de polinizadores, na proteção contra predadores, nos vegetais os OEs são considerados grandes fontes de agentes biocidas. (KNAA e FIUZA, 2010).

Esses compostos de carácter lipofílicos apresentam complexa composição química, onde podem apresentar de 20 a 60 componentes em concentrações diferentes. Apresentam de 1 a 3 componentes majoritários onde a variação pode chegar de 20% a 70% dos componentes do óleo. Os componentes majoritários na maioria das vezes determinam a atividade biológica do óleo. (BAKKALI *et al.*;2011).

Os OEs apresentam como composição química substâncias terpênicas, eventualmente fenilpropanóides acrescidos de moléculas menores como ésteres, álcoois, acetonas e aldeídos. (SIANI *et al.*, 2000; SUNBURG; PANTEN, 2006).

O interesse científico à cerca dos OEs, deve-se as suas diversas atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, antineoplásica, antiviral, antioxidante, inseticida e larvicida. (BUCHBAUER, 2010; CAVALCANTI *et al.*;2004). Dos 3000 OEs conhecidos, 300 são utilizados nas indústrias de medicamentos, alimentos, produtos de limpeza e cosméticos.

A extração é feita através de diversos métodos de extração e cada um possui suas diferenças nas variações de quantidade de óleos. Fatores como coleta, condições do clima e solo interferem na composição dos óleos.

Por sofrerem rápida oxidação e degradação faz-se necessário o uso de carreadores para liberação dos OEs, assim ocorre a diminuição da volatilização, oxidação e controle da liberação destes, tendo como resultado o aumento da vida útil dos óleos.

2.3 ÓLEO ESSENCIAL *Citrus sinensis* (OECS)

É um óleo de grande viabilidade por ser obtido a partir da casca da laranja, produto que geralmente é descartado, fator que o torna um produto de baixo custo de obtenção se comparado

a outros óleos essenciais. Podendo o rendimento girar em torno de 10 %. A composição principal do óleo são hidrocarbonetos mono e sesquiterpenicos e compostos oxigenados os quais são quimicamente instáveis. (JACKSON et al., 2002).

Aproximadamente 98% da composição do OE é o D-limoneno sendo assim sem componente majoritário e juntamente com outros compostos como o linol, mirceno e α -pineno, são responsáveis por suas atividades biológica. (LIU et al., 2012; SHARMA; TRIPATHI, 2008; SYOBODA; GREENAWAY, 2003). O componente majoritário D-limoneno é um monoterpene monocíclico que apresenta odor semelhante de limão e apresenta atividades flavorizantes, aromatizantes, repelente e a grande atividade larvívica contra larvas do *Ae. aegypti* (EZEONU; CHIMUDE; UDEDI, et al., 2001).

O óleo essencial *Citrus sinensis* é utilizado na indústria farmacêutica para mascarar sabores desagradáveis de certos fármacos, na indústria de cosmético e perfumaria em várias preparações e na indústria alimentícia como flavorizante em bebidas alcoólicas e não alcoólicas. (EZEONU et al., 2001; SHARMA; THIPATHI, 2008).

Mesmo com ampla aplicabilidade o OECS apresenta instabilidade a aquecimento, presença de ar, umidade e luz e é insolúvel em água. Devido a esse comportamento são estudados sistemas de liberação como lipossomas, nanogel/ nanopartículas de quitosana, microencapsulação, sistemas estabilizados por tensoativos. (FEITOSA et al., 2009 FERREIRA et al, 2015).

Um dos sistemas mais estudados é o estabilizado por tensoativos, emulsão, microemulsão, precursores de mesofases e mesofases-líquido cristalina, devido à propriedade de solubilização do óleo na fase aquosa pela formação de um filme interfacial do tensoativo dessa forma o OE estaria presente em gotículas, microestruturas ou nanoestruturas, dessa forma o óleo fica protegido de agentes externos que causam a sua instabilidade. (KIM et al., 2009; ZHENG et al., 2011, FERREIRA et al, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da concentração do tensoativo no comportamento de fase de emulsões cujo filme interfacial apresenta estrutura formada por cristal líquido, assim como avaliar a influência do comportamento de fase na atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as emulsões óleo/água;
- Caracterizar e avaliar as emulsões através do comportamento de fases e organização estrutural;
- Avaliar atividade larvicida do (s) sistema (s) contra as larvas do *Ae. aegypti*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

4.1.1 Materiais

- Bandejas;
- Béquer;
- Copos;
- Frascos de vidro;
- Proveta;
- Pipeta pasteur

4.1.2 Reagentes

- Ácido oleico, Vetec 97%, Brasil;
- Procetyl, (AWS ®), Croda;
- Óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck - (OECS), extraído no laboratório de farmacotécnica da UFS.

4.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético FISATOM®;
- Linha D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas – SP

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das formulações

As formulações foram preparadas a partir da zona de formação de emulsões descrita por Ferreira e colaboradores (2015). A tabela 2 apresenta a composição centesimal das emulsões.

Na preparação foi utilizado a mistura de tensoativo e cotensoativo na proporção 2:1 (Procetyl: ácido oleico). A referida mistura foi utilizada uma vez que em trabalho anterior

(FERREIRA et al, 2015) foi apresentada como mistura adequada para ampliar a região de formação de formulações estáveis em presença de mesofases líquido-cristalina. A mistura foi deixada sob agitação magnética durante 24 horas. Após passado esse tempo a concentração específica de OECS foi adicionada a mistura de tensoativos e deixado sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Passado 30 min as misturas foram diluídas com a fase aquosa, também a temperatura ambiente, sempre sob agitação e então, foi observado o aspecto.

Tabela 2. Composição centesimal das amostras selecionadas do diagrama. Fase Aquosa: Água. Tensoativo: Procetyl® e Cotensoativo: Ácido Oleico, Óleo essencial: Citrus sinensis.

AMOSTRA	Fase Aquosa (%)	OECS (%)	T/Cot. 2:1 (%)
E1	70	5	25
E3	85	5	10

4.2.2 Avaliação estrutural por espalhamento de raio X a baixo ângulo

O comportamento de fase das emulsões foi analisado por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) a temperatura ambiente. As medidas foram realizadas na linha D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas – SP, em monocromador do tipo Silício (111) produzindo feixe de raios X incidente ($\lambda = 1,55 \text{ \AA}$) colimado e detectado em um Dectris Pilatus 300k. A distância amostra - detector foi de 814 nm, permitindo um intervalo de medida do vetor de espalhamento, q ($q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$; $2\theta =$ ângulo de espalhamento) de 0,15 para 5,7 nm⁻¹. O espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra, foi subtraído da intensidade total da amostra. As curvas resultantes foram normalizadas levando em consideração os efeitos do decaimento natural, da intensidade da fonte de luz síncrotron, da sensibilidade do detector e da transmitância. Os dados foram tratados no software OriginPro v.8.

4.2.3 Atividade Larvicida

Foi realizado o ensaio larvicida em triplicata, usando variações de ppm (5 a 10, 12-15, 20-25) para as concentrações do óleo. Sendo que em cada ensaio foram submetidas 20 larvas Rockfeller de *Ae. Aegypti* no estágio L3 e L4, provenientes do insetário do Departamento de Morfologia da UFS. As contagens das larvas foram feitas através de pipetas pasteur em copos descartáveis de 150 mL e ao final o volume foi completado para 100 mL. Logo após adicionou-se a emulsões. Avaliou a quantidade de larvas mortas após 24h, levando em consideração as larvas que não apresentavam movimento. A análise estatística foi realizada a partir da determinação da concentração letal que mata 50% das larvas (CL50) e o intervalo de confiança para cada composto foi calculado. Os dados foram submetidos à análise probítica, de acordo com FINNEY (1971).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPORTAMENTO DE FASE

As curvas de SAXS (figura 6) representam a relação entre a intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) nm^{-1} . Foi possível sugerir a presença de picos de correlação com valores específicos no eixo q . De acordo com a figura 6 é sugerido a formação de um filme interfacial complexo. A partir da correlação entre os picos foi possível obter valores aproximados que sugerem a formação de fase hexagonal: Para E1 $q_3/q_1 = 2,37$ (valor teórico = 2); $q_4/q_1 = 3,52$ (valor teórico para raiz de 7 = 2,64); Para E3 $q_2/q_1 = 1,71$ (valor teórico = 1,73); $q_3/q_1 = 2,85$ (valor teórico = 2).

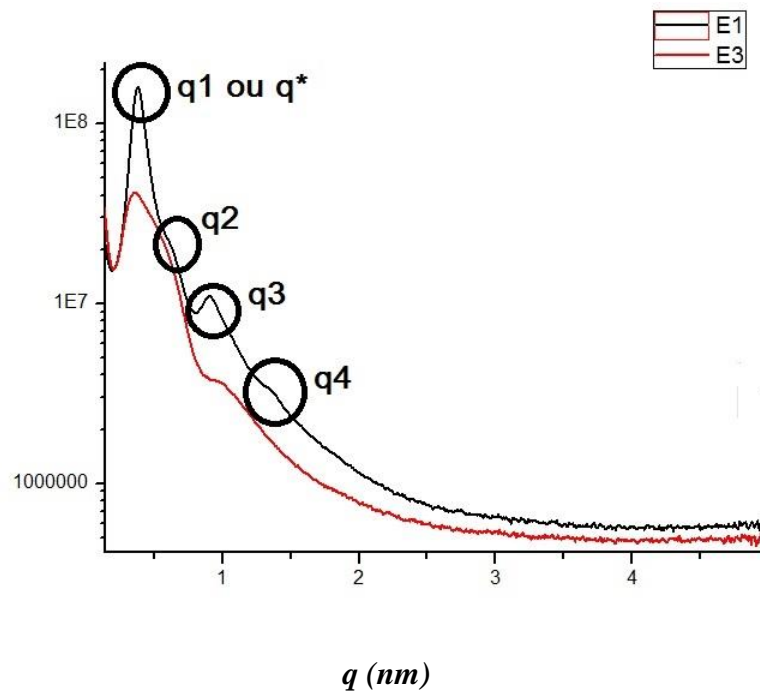


Figura 6. Curvas de SAXS das emulsões E1 e E3

AMOSTRAS	PICOS	VALORES TEÓRICOS
E1	$q3^*/q1^*=2,37$	2
E1	$q4^*/q1^*= 3,52$	2,64
E3	$q2/q1 = 1,71$	1,73
E3	$q3/q1= 2,85$	2

A estrutura dos cristais líquidos pode ser verificada de acordo com a posição dos picos no eixo do vetor de espalhamento q conforme é possível observar na figura 6. Para cristais do tipo lamelar, a posição relativa dos picos em relação ao primeiro pico, mais intenso, deve obedecer à relação 1: 2: 3, enquanto que, para estruturas hexagonais a relação é de 1: $\sqrt{3}$: 2: $\sqrt{7}$. E para cristais líquidos de fase cúbica, a relação é 1,41:1,73: 2,82: 3 (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN,1997; FORMARIZ *et al*, 2007; YARIV *et al*, 2010).

Os valores encontrados são aproximados o que sugere a tendência a formação de fase hexagonal na interface óleo/água. O Procetyl, tensoativo utilizado, apresenta PEC menor que 1 e maior que $\frac{1}{2}$. Ao interagir com o meio aquoso, o Procetyl, apresenta a habilidade de formar estruturas organizadas do tipo mesofases líquido-cristalina. Tendência que se confirma nos resultados obtidos. A formulação E3 apresenta valores mais próximos da relação hexagonal, apesar de ter os picos apresentados de forma menos nítida. Apesar de apresentar menor concentração de tensoativo, quando comparada com a E1, apresenta maior quantidade de água fato que sugere uma maior interação com o tensoativo e consequente tendência a formação da mesofase hexagonal. A técnica de SAXS fornece informações que relacionam as dimensões estruturais dos aglomerados de tensoativos em dimensões maiores que as dimensões atômicas. Sendo assim, o domínio típico para esta técnica compreende valores de “ q ” inferiores a 100nm. (MERTINS, 2004; PEREIRA, 2004; YARIV *et al*, 2010)

Este tipo de avaliação apresenta limitações ao ser empregado em sistemas emulsionados. Sendo estes classificados como sistemas heterogêneos grosseiros, devido ao tamanho das gotículas que compõem a fase dispersa. Nestes sistemas o filme interfacial formado pelo tensoativo se apresenta na forma de monocamadas. As emulsões apresentam

tamanho acima do limite de avaliação da técnica. Quando há possibilidade de formação de outros tipos de agregados na estrutura do filme interfacial, em emulsões, as medidas de SAXS podem ser empregadas e sugerem diferentes comportamentos de fases em função da presença de cristais líquidos conforme foi possível observar.

A relação entre o comportamento de fase em emulsões e as propriedades de interface óleo/água tem sido investigada a cerca de meio século. Stig Friberg (1971) levantou várias questões a respeito do comportamento de fases de emulsões que apresentavam diferentes formas de organização estrutural em seus respectivos filmes interfaciais. Diversos autores têm investigado sistemas emulsionados considerando a presença de mesofases líquido-cristalinas, caracterizando assim como sistemas mistos (S. MELE, *et al*, 2003; S. E. FRIBERG, 2006 P. KUDLA *et al*, 2010; K. KAIZU, P. ALEXANDRIDIS, 2016).

Stefania Mele e colaboradores (2003) investigaram sistemas multicomponentes e observaram que, como uma regra geral, emulsões podem ser obtidas pela adição de solutos hidrofílicos em fase líquido-cristalina. Estes sistemas podem ser obtidos a partir da utilização da monoleína e podem ser avaliados por microscopia ótica de luz polarizada devido a presença de anisotropia. Petra Kudla e colaboradores (2010) investigaram o comportamento de fase de uma mistura que continha como tensoativo com uma mistura de álcoois graxos e água. Os autores observaram que a depender do equilíbrio de fases obtido em função da concentração de tensoativo sistemas emulsionados eram obtidos diferentes aglomerados produtos da autoagregação do tensoativo na presença da água. Foi possível observar o comportamento de fases por SAXS. Com picos de correlação que demonstraram a presença de mesofases líquido cristalina.

Kazuhiro Kaizu & Paschalis Alexandrilis (2016) investigaram o papel de copolímeros tri-bloco no comportamento de fases de emulsões. Os autores observaram que os sistemas apresentaram uma variedade de fases: fase aquosa contínua e fase oleosa limitada por um filme interfacial formado por mesofase líquido-cristalina. Os autores confirmaram estas estruturas pela técnica de SAXS.

5.2 ATIVIDADE LARVICIDA

O ensaio larvicida das emulsões E1, e E3 foram conduzidos em um de período de 24hs. Foi possível observar atividade tóxica contra as larvas do *Ae. Aegypti* nos estágios L3 e L4, no

período avaliado. A tabela 3 apresenta os valores de CL_{50} para cada amostra e seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 3. CL_{50} das amostras E1, e E3 frente às larvas de *Ae. aegypti* em L3/ L4, após 24hs de exposição.

Amostra	CL_{50} (95% IC) ppm (24hs)
E1	18,47 (16,13 – 22,45)
E3	12,53 (11,63 – 13,69)

Nota: 95% IC – Intervalo de Confiança com probabilidade de 95%. CL_{50} – concentração letal necessária para matar 50% da exposição exposta. ppm – partes por milhão.

As emulsões E1 e E3 mostraram-se eficazes frente à atividade larvicida contra o *Ae. Aegypti*, a E1 com valor de CL_{50} de 18,47 ppm e E3 com CL_{50} de 12,53ppm. O melhor resultado foi observado para a formulação E3. O valor da CL_{50} do d-limoneno, principal constituinte do óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentou valor de CL_{50} de 21ppm segundo Silva e colaboradores (2008). Possivelmente o resultado encontrado para as formulações E1 e E3, principalmente para E3, está relacionado com a sugestão de formação de filme interfacial de estrutura hexagonal. Conforme observado nos resultados de SAXS a formulação E3 tem uma tendência a correlação entre os picos mais próxima da correlação descrita para a fase hexagonal. Este domínio apresenta dimensões menores, em escala, nanométrica, fato que pode sugerir o aumentando do potencial de dispersão do óleo essencial na fase aquosa, sendo assim o motivo pelo menor valor de CL_{50} da formulação E3.

6 CONCLUSÃO

As Emulsões com o sentido de fases óleo/água foram obtidas com êxito com a manutenção da dispersão durante toda a fase de estudo. Com os resultados obtidos foi possível melhorar a atividade larvícida do óleo nas formulações. A formulação E3 quando comparada a E1 apresentou melhor resultado, uma vez que um aparente comportamento de fase característico de mesofase líquido-cristalina do tipo hexagonal foi observado de forma mais organizada em relação a E1. Resultados que expressam a influência da presença de mesofase líquido-cristalina no filme interfacial, assim como confirmam que a presença destas fases nestes sistemas multicomponentes influencia as propriedades das formulações.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMAR-YULI, D. LIBSTER, A. ASERIN AND N. GARTI. **Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesofases**. Current Opinion in Colloid & Interface Science, v.14, n.1 p. 21-32, 2009

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E.W. P. **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.**, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

Costa AMB. **Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples para controle larvicida do *Aedes aegypti***. [Dissertação]. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe; 2010.

COSTA, A. M. B. **Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck pelo método de coacervação simples para o controle larvicida do *Aedes aegypti***. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Sergipe – UFS, São Cristóvão, SE, Brasil, 2010.

CRODA DO BRASIL. **Folha de informações de segurança de produto químico – FISPQ**. Procetyl AWS, 2002.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**, 3ed., São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. **Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FRIBERG, S. **Liquid crystalline phases in emulsions** J. Colloid Interface Science, 37 (1971), pp. 291-295, 1971.

GERIS R, RIBEIRO PR, BRANDÃO MS, DA SILVA, HHG, DA SILVA IG. **Bioactive Natural Products as Potencial Candidates to Control *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue**. In: Studies in Natural Products Chemistry, 37 ed. Oxford: Elsevier; 2012: cap, 10.

KAIZU, K.; ALEXANDRIDIS, P. **Effect of surfactant phase behavior on emulsification**, In Journal of Colloid and Interface Science, v. 466, p. 138-149, 2016.

KUDLA, P., SOKOLOWSKI, T., BLÜMICH, B., WITTERN, K.-P. **Phase behavior of liquid-crystalline emulsion systems**. Journal of Colloid and Interface Science, 349 (2), pp. 554-559, 2010.

MELE, S.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M. **Monoolein based liquid crystals to form long-term stable emulsions**. In Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 228, Issues 1–3, p. 57-63, 2003.

RESENDE, G, M, Q. **Estudo da formação de microemulsões contendo óleo essencial de Citrus sinensis (L.) Osbeck: Efeito dos cotensoativos e avaliação da interação das microemulsões de estrato córneo**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Sergipe – UFS, São Cristóvão, SE, Brasil, 2013.

SANTOS A. **Sistemas emulsionados a base de óleo essencial de Citrus sinensis L. Osbeck: Caracterização e avaliação do efeito contra larvas de Aedes aegypti**. [Dissertação] Sergipe: Universidade Federal de Sergipe; 2012.